

痹通药酒中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量

樊磊磊^{1*}, 杨艳玲², 刘乃强¹, 李振国¹, 温自力³, 李中亚³

(1. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2. 河南中医学院, 郑州 450003;
3. 汝州市四知堂药业有限公司, 河南 汝州 467500)

[摘要] 目的: 建立痹通药酒中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的 HPLC 含量测定方法。方法: Agela Promosil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 35 °C, 流动相乙腈-四氢呋喃 (25:15) 为流动相 A, 以 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL) 为 B, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm。结果: 新乌头碱在 0.118 9 ~ 0.990 9 μg 呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$), 平均加样回收率 98.07%, RSD 1.7%; 次乌头碱在 0.074 5 ~ 0.621 0 μg 呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$), 平均加样回收率 99.08%, RSD 1.5%; 乌头碱在 0.009 4 ~ 0.078 3 μg 呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$), 平均加样回收率 98.32%, RSD 2.0%。结论: 本方法稳定易行、重复性好, 可用于痹通药酒质量评价。

[关键词] 痹通药酒; 新乌头碱; 次乌头碱; 乌头碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)22-0098-03

Determination of Mesaconitine, Hypaconitine, Aconitine in Bitong Medicated Wine

FAN Lei-lei^{1*}, YANG Yan-ling², LIU Nai-qiang¹, LI Zhen-guo¹, WEN Zi-li³, LI Zhong-ya³

(1. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;
2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;
3. Ruzhou Sizhi Tang Co. Ltd., Ruzhou 467500, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of mesaconitine, hypaconitine, aconitine in Bitong medicated wine. **Method:** A Agela Promosil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase consisted of acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15, phase A), 0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate (containing 0.5 mL glacial acetic acid per 1 000 mL, phase B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was at 235 nm. **Result:** The linear range of mesaconitine was 0.118 9-0.990 9 μg ($r = 0.999 9$). The average recovery was 98.07% with RSD of 1.7%. The linear range of hypaconitine was 0.074 5-0.621 0 μg ($r = 0.999 9$). The average recovery was 99.08% with RSD of 1.5%. The linear range of aconitine was 0.009 4-0.078 3 μg ($r = 0.999 9$). The average recovery was 98.32% with RSD of 2.0%. **Conclusion:** The developed method was reliable, and can be used for the quality control of Bitong medicated wine.

[Key words] Bitong medicated wine; mesaconitine; hypaconitine; aconitine; HPLC

痹通药酒由草乌、当归等 4 味药制成, 现收载于
中药成方制剂第十九册, 具有温经止痛、活血祛风之

功效, 用于风湿麻木、腰背冷痛、风湿、类风湿关节炎、坐骨神经痛、骨质增生等^[1]。方中君药草乌作为一种毒性药材, 由于其所含双酯型生物碱类成分的治疗剂量和中毒剂量非常接近^[2], 需对其进行严格控制。据处方分析, 草乌为主药, 所含多种生物碱, 具有抗寒冷、镇痛和抗炎作用, 与中医理论的祛风、散寒、镇痛作用基本一致, 故以方内草乌中的生

[收稿日期] 20120213(013)

[基金项目] 国家药品标准提高研究课题(227)

[通讯作者] * 樊磊磊, 硕士, 主管药师, 从事药品质量标准及化学物质的非法添加检测研究, Tel: 13523446978, E-mail: fan2lei@qq.com

物碱为定量指标。分析方法有:用二阶导数光谱法测定草乌中总生物碱的含量;用酸性染料比色法测定草乌中生物碱含量,并用薄层层析法对其所含有毒的双酯型生物碱乌头碱、中乌头碱、次乌头碱进行限量检查^[3]。本文采用高效液相色谱法对草乌所含的毒性较大、同时又是确保痹通药酒药效的双酯型类生物碱成份:新乌头碱、次乌头碱及乌头碱进行含量测定研究,这对确保该药品的安全性、有效性,具有明确的针对性和良好的质控意义。

1 材料

Ultimate 3000 高效液相色谱仪配 Chromeleon 工作站、紫外检测器(美国戴安), Agela Promosil- C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) (博纳艾杰尔科技有限公司), AE-240 型电子分析天平(梅特勒-托利多), SK3300H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司), 电热恒温水浴锅(北京科伟永鑫实验仪器设备厂);新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 110799-200404, 110720-200410, 110798-200404);痹痛药酒(汝州市四知堂药业有限公司);乙腈、甲醇均为色谱纯(Merck 公司)、四氢呋喃色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司)、水为超纯水。

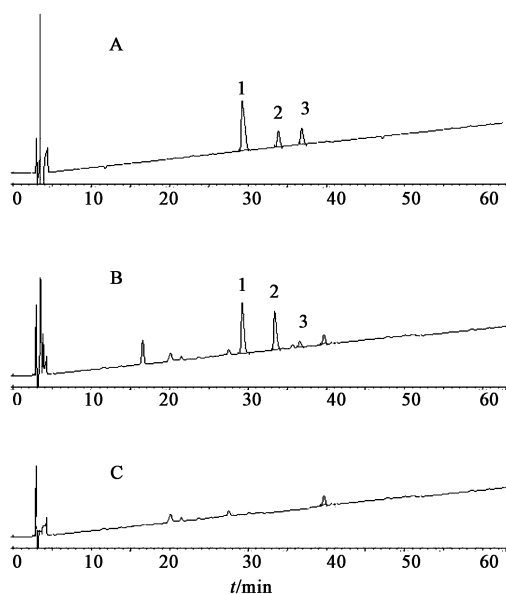
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Agela Promosil- C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 柱温 35 $^{\circ}$ C, 以乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A, 以 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)为流动相 B, 梯度洗脱(0 ~ 38 min, 15% ~ 26% A; 38 ~ 38.1 min, 26% ~ 40% A; 38.1 ~ 48 min, 40% A; 48 ~ 48.1 min, 40% ~ 15% A; 48.1 ~ 63 min, 15% A), 检测波长 235 nm^[4], 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备 取新乌头碱、次乌头碱、对照品适量, 精密称定, 加乙腈制成每 1 mL 含新乌头碱 0.031 3 mg、次乌头碱 0.248 4 mg 和乌头碱 0.396 4 mg 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 40 mL 在 40 $^{\circ}$ C 水浴挥发乙醇至约 2 mL, 用 2% 盐酸 3 次洗涤(10, 10, 10 mL, 共 30 mL), 洗涤液均转入分液漏斗后, 用无水乙醚 10, 10 mL 萃取 2 次, 弃去乙醚液, 加氨试液, 调 pH 9.5, 再用无水乙醚 20, 20, 20 mL 萃取 3 次, 合并乙醚萃取液, 置蒸发皿中, 40 $^{\circ}$ C 水浴挥发至干, 乙腈洗涤残渣, 洗液全部转入 2 mL 量瓶, 定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 根据处方去掉制草乌,



1. 新乌头碱;2. 次乌头碱;3. 乌头碱
图1 混合对照品溶液(A)、痹通药酒供试品溶液(B)和阴性对照溶液(C)的HPLC

按制备工艺制成缺草乌(制)药材的阴性样品, 同时制备供试品溶液, 制得阴性对照溶液。

2.5 线性关系的考察 精密吸取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的混合对照溶液(0.031 3, 0.248 4, 0.396 4 $g \cdot L^{-1}$) 3, 5, 10, 15, 20, 25 μ L 按上述色谱条件依次测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 计算回归方程。新乌头碱 $Y = 7.591 5X - 11.502$ ($r = 0.999 9$), 线性范围 0.118 9 ~ 0.990 9 μ g; 次乌头碱 $Y = 4.939 3X - 6.914 5$ ($r = 0.999 9$), 线性范围 0.074 5 ~ 0.621 0 μ g; 乌头碱 $Y = 0.565 4X - 0.948 9$ ($r = 0.999 9$), 线性范围 0.009 4 ~ 0.078 3 μ g。

2.6 精密度试验 精密吸取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱峰面积的 RSD 分别为 2.88%, 2.52%, 1.22%。

2.7 重复性试验 进样测定, 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量平均值分别为 0.028, 0.021, 0.003 $g \cdot L^{-1}$, RSD 分别为 2.1%, 1.8%, 2.5%。

2.8 稳定性试验 按供试品溶液的制备项下方法操作, 制得供试品溶液后, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 测得新乌头碱、次乌头碱、乌头碱含量的 RSD 分别为 1.3%, 1.7%, 1.6%。结果表明, 供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的一批痹通药酒样品 20 mL, 分别精密加入一定量的对照品溶液, 按供试品溶液的制备项下方法操作, 制得供试品溶液 6 份, 并进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的回收率试验

被测成分	取样量 /mL	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
新乌头碱	20	0.592	0.573	1.148	97.01	98.07	1.7%
	20	0.592	0.573	1.165	100.03		
	20	0.592	0.573	1.148	97.05		
	20	0.592	0.573	1.148	97.01		
	20	0.592	0.573	1.167	100.29		
	20	0.592	0.573	1.148	97.03		
次乌头碱	20	0.442	0.416	0.858	100.01	99.08	1.5%
	20	0.442	0.416	0.856	99.61		
	20	0.442	0.416	0.848	97.71		
	20	0.442	0.416	0.846	97.01		
	20	0.442	0.416	0.854	99.09		
	20	0.442	0.416	0.862	101.03		
乌头碱	20	0.064	0.067	0.129	97.01	98.32	2.0%
	20	0.064	0.067	0.132	101.49		
	20	0.064	0.067	0.129	97.11		
	20	0.064	0.067	0.129	97.02		
	20	0.064	0.067	0.131	100.18		
	20	0.064	0.067	0.129	97.08		

2.9 样品测定 取 6 批痹通药酒样品,按供试品溶液的制备项下方法操作,测定样品中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量,见表 2。

表 2 6 批痹通药酒中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量 $g \cdot L^{-1}$

样品批号	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱
1	0.028 7	0.020 6	0.002 8
2	0.030 4	0.023 6	0.002 8
3	0.029 6	0.022 1	0.003 2
4	0.028 0	0.019 8	0.003 6
5	0.031 2	0.021 8	0.002 5
6	0.028 9	0.020 1	0.003 2

3 讨论

在制备供试品溶液制备实验中,发现新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对温度比较敏感,高温处理样品会使这 3 成分含量降低;分别选用异丙醇-三氯甲烷(1:1)^[4]、异丙醇-乙酸乙酯(1:1)^[4]和乙醚溶剂对痹痛药酒进行萃取实验,发现采用乙醚萃取所得实验效果最佳。

比较两种流动相乙腈-0.2% 乙酸(浓氨水调 pH 10.00)^[5]及乙腈-四氢呋喃(25:15)-0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)梯度洗脱^[6],发现后者所得峰形好、分离效果佳。

[参考文献]

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂. 第十九册[S]. 1998;239.
- [2] 马芳,赵东,吴晓霞,等. LC-MS-MS 法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):95.
- [3] 陈建真,陈建明. 小活络丸的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(4):57.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010;220.
- [5] 林华,邓广海. 川乌 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):73.
- [6] 黄志芳,易进海,陈东安,等. 附片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):49.

[责任编辑 顾雪竹]